INSTITUUT VOOR PLANTENZIEKTENKUNDIG ONDERZOEK
WAGENINGEN, NEDERLAND
DIRECTEUR: Dr. J. G. TEN HOUTEN

MEDEDELING No 230

DE INVLOED VAN ENIGE VIRUSSEN OP DE CONCENTRATIES VAN ORGANISCHE ZUREN IN EEN AANTAL PLANTEN

(THE INFLUENCE OF SOME VIRUSES ON THE CONCENTRATIONS OF ORGANIC ACIDS IN A NUMBER OF PLANTS)

DOOR

J. H. VENEKAMP

OVERDRUK UIT:
T. PL.-ZIEKTEN, 65: 177–187, 1959

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
9 SEP 1960

INSTITUUT VOOR PLANTENZIEKTENKUNDIG ONDERZOEK (I.P.O.)

Office and main laboratory: Binnenhaven 4a, tel. 2151, 2152 en 3641 Wageningen, The Netherlands.

Staff:

Director:	Dr. J. G. TEN HOUTEN.
Deputy Director and head of the Entomological Dept.:	Dr. H. J. DE FLUITER, Wageningen.
Deputy head of the Mycological Dept.:	Ir. G. S. ROOSJE, Goes.
Head of the Nematological Dept.:	Dr. Ir. J. W. SEINHORST, Wageningen.
Head of the Plant Disease Resistance Dept.:	Dr. J. C. s'JACOB, Wageningen.
Head of the Virological Dept.:	Miss Dra. F. QUAK, Wageningen.
Head of the Section Agricultural Aviation:	Miss M. C. KERSSEN, Wageningen.
Head of the Section Biochemical Research and Application of Radioactive Isotopes:	Dr. J. H. VENEKAMP, Wageningen.
Head of the Section Air Pollution Problems:	Ir. F. H. F. G. SPIERINGS, Wageningen.

Research workers at the Wageningen Laboratory:

Dr. Ir. A. B. R. BEEMSTER, Virologist
Miss Dra. S. DE BOER, Phytopathologist
Ir. J. A. DE BOKX, Virologist
Dr. Ir. L. BOS, Virologist
Dr. H. H. EVENHUIS, Entomologist
Dr. H. J. DE FLUITER, Entomologist
Dr. C. J. H. FRANSSEN, Entomologist
Dr. J. GROSJEAN, Phytopathologist
Ir. N. HUBBELING, Phytopathologist and plantbreeder
Dr. J. C. s'JACOB, Phytopathologist and plantbreeder
Miss M. C. KERSSEN, Agricultural aviation expert
Miss Dr. C. H. KLINKENBERG, Nematologist
Ir. R. E. LABRUYÈRE, Phytopathologist
Drs. H. P. MAAS GEESTERANUS, Phytopathologist
D. Z. MAAT, Virologist
F. A. VAN DER MEER, Entomologist
Dr. J. C. MOOI, Phytopathologist
W. C. NIJVELDT, Entomologist
Ir. H. DEN OUDEN, Nematologist
Miss Dra. H. J. PFAELTZER, Virologist
Ir. A. VAN RAAY, Plantphysiologist
Miss Dra. F. QUAK, Virologist
Dr. Ir. J. W. SEINHORST, Nematologist
Dr. H. H. SOL, Virologist
Ir. J. VAN DER SPEK, Phytopathologist
Ir. F. H. F. G. SPIERINGS, Plantphysiologist
Dr. F. TJALLINGII, Phytopathologist
Dr. J. H. VENEKAMP, Biochemist
Drs. J. C. ZADOKS, Phytopathologist

Research workers elsewhere:

Drs. J. M. M. v. BAKEL, Phytopathologist; Drs. L. E. VAN 'T SANT, Entomologist — detached to „Proefstation voor de Groenteteelt in de volle grond", Alkmaar, tel. 0 2200-4568.

Drs. D. J. DE JONG, Entomologist; Ir. G. S. ROOSJE, Phytopathologist; M. VAN DE VRIE, Entomologist — detached to „Proefstation voor de Fruitteelt in de volle grond", Wilhelminadorp, Goes, tel. 0 1100-2261

Ir. T. W. LEFERING, Phytopathologist/Virologist, detached to „Proeftuin Noord Limburg" Venlo, tel. 0 4700-2503.

Ir. F. A. HAKKAART, Virologist; Drs. G. SCHOLTEN, Phytopathologist — detached to „Proefstation voor de bloemisterij in Nederland", Aalsmeer, tel. 0 2977-688.

Dr. K. VERHOEFF, Phytopathologist, detached to „Proeftuin voor de Groente- en Fruitteelt onder glas", Naaldwijk, tel. 0 1740-4545.

Guest workers:

Dr. P. A. VAN DER LAAN, Entomologist, „Laboratorium voor toegepaste Entomologie der Gemeente Universiteit", Amsterdam, tel. 0 2900-56282.

Dr. Ir. G. S. VAN MARLE, Entomologist, Diepenveenseweg 226, Deventer, tel. 0 6700-3617.

Ir. G. W. ANKERSMIT, Entomologist, „Laboratorium voor Entomologie", Agricultural University, Wageningen, tel. 0 8370-2438.

Dr. Ir. J. B. M. VAN DINTHER, Entomologist, „Laboratorium voor Entomologie", Agricultural University, Wageningen, tel. 0 8370-2438.

Aphidological Adviser:

Mr. D. HILLE RIS LAMBERS, Entomologist, T.N.O., Bennekom, tel. 0 8379-2458.

T. Pl. ziekten 65 (1959): 177–187

DE INVLOED VAN ENIGE VIRUSSEN OP DE CONCENTRATIES VAN ORGANISCHE ZUREN IN EEN AANTAL PLANTEN[1]

With a summary: The influence of some viruses on the concentrations of organic acids in a number of plants

DOOR

J. H. VENEKAMP

Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen

INLEIDING

Uit een bescheiden aantal onderzoekingen, betreffende het verband tussen virussynthese en de veranderingen in organische zuren, is een duidelijke wederkerige invloed geconstateerd. Zo vond NOUR-ELDIN (1955) een verhoogde vermeerdering van tabaksmozaïekvirus in bladschijfjes van Turkse tabak, wanneer deze 24 uur na de inoculatie uit de bladeren geponst en in oplossingen van citroen-, α-ketoglutaar-, barnsteen- en appelzuur gelegd werden. Deze bevordering van de tabaksmozaïekvirussynthese werd in gelijksoortige experimenten met een groot aantal overeenkomstige zuren door SCHLEGEL (1957) bevestigd. Bovendien bleek glucose-1-fosfaat volgens SCHLEGEL & RAWLINS (1954) een stimulerende werking op deze virussynthese te hebben.

SEGRETAIN & HIRTH (1953) wezen op een hoger tabaksmozaïekvirusgehalte door asparagine- en glutaminezuur.

Het effect van Y-virus in anaeroob bewaarde aardappelen op de verhoging van de melkzuurconcentratie werd door BOSER (1957) waargenomen. HENKE (1954) vond een verhoogd citroenzuurgehalte in door vergelingsziekte aangetaste suikerbieteplanten.

Genoemde publikaties betreffen slechts bepaalde aspecten van de wederzijdse invloed van de virusinfectie en de organische zuren, zodat het gewenst was om een algemener onderzoek naar de gevolgen van de virusinfectie op de stofwisseling van genoemde zuren te verrichten. Vergeleken werden de concentraties van de organische zuren in gezonde en met verschillende virussen geïnfecteerde planten.

MATERIAAL EN METHODIEK

De in dit onderzoek betrokken plantesoorten waren *Lycopersicum esculentum* var. Ailsa Gray, *Nicotiana tabacum* var. White Burley en *Physalis floridana*, gekweekt uit zaad in potculturen bij 19°C gedurende de vier laatste maanden van 1958. Van een groot aantal exemplaren van eenzelfde soort werden partijen van 40 of 60 stuks geïnoculeerd, elke groep met een bepaald virus, terwijl de overige niet-geïnoculeerde planten de vergelijking van de zieke met de gezonde mogelijk maakten. De tabaksplanten waren bij de inoculatie 38 dagen en de tomaten 35 dagen oud. *Physalis*-zaad werd eerst op vochtig filtreerpapier voorgekiemd. Deze kiemplantjes waren na 44 dagen geschikt om in potten te

[1] Aangenomen voor publikatie 25 september 1959.

worden verspeend. Tachtig dagen na het verspenen kon hier de virusoverbrenging worden uitgevoerd.

De virussen, welke met behulp van carborundum mechanisch werden overgebracht, waren aardappel-X-virus (severe strain, afkomstig uit aardappel), aardappel-Y-virus (eveneens afkomstig uit aardappel), tabaksmozaïekvirus (severe strain, geïsoleerd uit tabak) en een kersevirus. Het laatste veroorzaakte op de kers rozetziektesymptomen en was overgebracht op komkommerplanten (PFAELTZER, 1959). Sap van deze komkommerplanten werd gebruikt voor de inoculatie van de hierboven genoemde proefplanten. Behalve van deze virussen werd ook de invloed van bladrolvirus bij *Physalis* en tomaat onderzocht, nadat dit van *Physalis floridana* door *Myzus persicae* was overgebracht (10 bladluizen op elke plant). Vier en twintig uur, nadat de luizen op de te onderzoeken planten waren gebracht, werden de dieren gedood door bespuitingen met TEPP en tenslotte werd de kas uitgerookt met nicotine.

Gelijktijdig met de inoculaties werden 20 planten geoogst, gewogen en gedurende 5 minuten in een hoeveelheid water van tweemaal het vers gewicht gekookt. De suspensie, welke na vermalen in een mixer werd verkregen, werd in een hydraulische pers onder een druk van 10.000 atm. uitgeperst, het perssap gedurende 10 minuten bij 8000 t. p.m. gecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof afgeschonken. Het was voldoende, het residu eenmaal in een weinig water te suspenderen en opnieuw gedurende 15 minuten bij 8000 t. p.m. te centrifugeren. Zuivering was mogelijk door de bij elkaar gevoegde bovenstaande vloeistoffen door een sterke kationwisselaar Imac C 12 (30 $\times$ 1,2 cm) te percoleren, waardoor de in het extract voorkomende kationen werden gebonden. Ongehinderd passeerden de organische zuren en koolhydraten. Proefnemingen toonden aan, dat verdere zuivering voor een analyse niet noodzakelijk was. Het aldus verkregen percolaat werd in vacuo bij 40–50°C ingedampt en ten slotte onder een warme luchtstroom gedroogd.

Zeven, 14 en 21 dagen na de inoculaties werden van elke groep 20 planten genomen en elk monster volgens het bovenstaande geëxtraheerd.

Ten slotte werd een analyse gedaan van zieke en gezonde White Burley-tabaksplanten, gekweekt op KNOP-HOAGLAND-oplossing. De helft van deze planten werd vier weken na het uitzaaien geïnoculeerd met tabaksmozaïekvirus, afkomstig van tabak, en 21 dagen na de inoculatiedatum werden, zowel uit de gezonde als uit de zieke planten, volgens de reeds beschreven wijze preparaten bereid.

De aldus bereide preparaten bevatten de in plant voorkomende organische zuren. Om het gehalte van elk zuur te bepalen, werd het gedroogde preparaat opgelost in 0,5 ml 0,5 n H_2SO_4. Deze oplossing werd opgenomen in 1 g droge silicagel (bereid volgens de methode van NIJKAMP, 1954), die daarna in een weinig chloroform, uitgeschud met 0,5 n H_2SO_4, werd gesuspendeerd.

De silicagelzuil, welke de scheiding van de organische zuren mogelijk maakte, werd geprepareerd volgens de methodiek van BULEN, VARNER & BURRELL (1952) uit 4 g silicagel, gesuspendeerd in 2,75 ml water en 70 ml chloroform, eveneens uitgeschud met 0,5 n H_2SO_4. Door de suspensie in een glazen buis van 1,2 cm doorsnede (fig. 1) te gieten en onder een waterdruk van 1 m te laten bezinken, kon het in silicagel opgenomen preparaat op de verkregen zuil worden gebracht. Nadat dit preparaat onder dezelfde waterdruk bezonken was, werd de zuil op een fractieverzamelaar (VENEKAMP, 1955) geplaatst. Op de zuil kwamen ver-

volgens een capillair van 75 cm lengte en 2 mm doorsnede en daarop een scheitrechter van 500 ml, gevuld met 50 ml solvent, bestaande uit een mengsel van 95 delen chloroform en 5 delen n-butanol, uitgeschud met 0,5 n H_2SO_4. Door de capillair even op te lichten, stroomde de vloeistof door naar de zuil. Wanneer de onderkant van genoemde opzet juist onder het vloeistofniveau boven de zuil was, werd de capillair weer op de zuil gedrukt. Hierdoor was een gesloten vloeistofkolom van de zuil naar de scheitrechter tot stand gekomen. Door de verzamelaar werd het effluent in fracties van 2,5 ml verdeeld. De buizen in dit apparaat waren van te voren met 1 ml water gevuld om de verdamping van het solvent tegen te gaan. Wanneer het solvent de zuil gepasseerd had, werd het achtereenvolgens vervangen door de volgende mengsels:

68 ml	85	delen	chloroform	en	15	delen	n-butanol
50 ml	75	,,	,,	,,	25	,,	,,
150 ml	65	,,	,,	,,	35	,,	,,
150 ml	50	,,	,,	,,	50	,,	,,

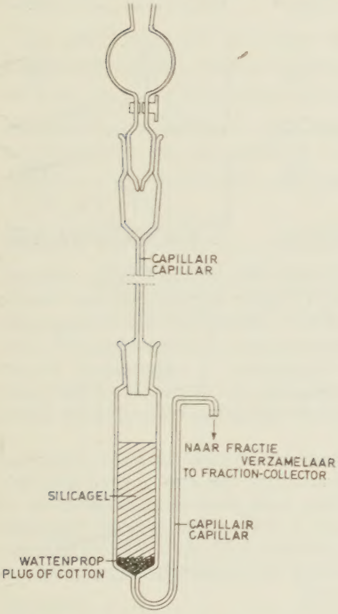

FIG. 1. De silicagel zuil in de chromatografiebuis met een hevel. Op de buis een capillair met scheitrechter, waarin het solvent.

The silicagel column in the chromatographic tube with a siphon. On the tube a capillar with a separatory funnel, in which the solvent.

De fracties werden met 0,01 n NaOH tegen broomthymolblauw als indicator getitreerd. Werden de titratiegetallen in een grafiek langs de verticale as tegen het fractienummer langs de horizontale as uitgezet, dan ontstond een beeld zoals in fig. 2. Daar elk zuur correspondeert met een bepaalde piek, kan men de concentratie berekenen uit de som van de titratie getallen, behorende bij deze piek.

Gewoonlijk worden deze chromatografische scheidingen onder druk uitgevoerd. Daar voor de organische zuren vijf opeenvolgende solvents nodig zijn, wordt door de opstelling zoals in fig. 1 vermeden, dat de zuil door onvoorziene omstandigheden droog komt te staan. Door tussen de zuil en de scheitrechter een lange capillair te plaatsen, staat op de silicagel zoveel druk, dat een voldoende snel percoleren van het solvent gegarandeerd is. Omdat aan de chromatografiebuis een capillairhevel van 2 mm doorsnede en met een uitmonding van een paar cm boven de zuil bevestigd is, heeft men de zekerheid, dat boven de zuil steeds vloeistof aanwezig blijft, wanneer de hoeveelheid solvent uit de scheitrechter door de zuil gepercoleerd is.

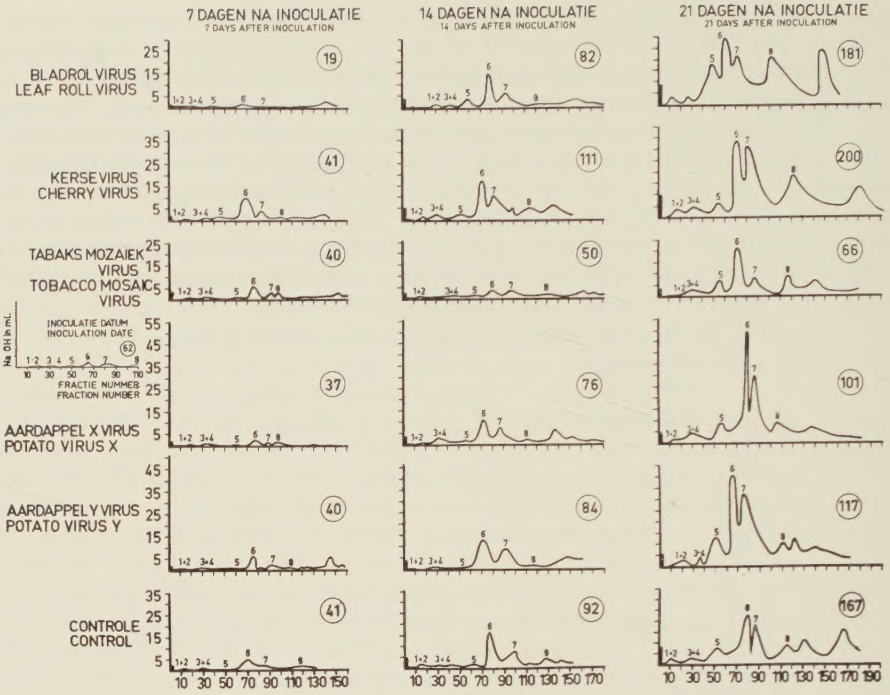

FIG. 2. De fractionering van organische zuren uit tomateplanten door silicagel zuilen. Abscis: fractienummer; ordinaat: hoeveelheid 0,01 n NaOH, welke het zuur in elke fractie neutraliseerde; volume van elke fractie 2,5 ml; solvent: chloroform met toenemende hoeveelheid n-butanol; organische zuren: 1. pyrodruivezuur, 2. barnsteenzuur, 3. α-ketoglutaarzuur, 4. aconietzuur, 5. oxaalzuur, 6. appelzuur, 7. citroenzuur, 8. iso-citroenzuur; de cijfers in de cirkels geven het vers gewicht van de planteweefsels aan, waaruit het onderzochte preparaat werd bereid (nader aangeduid als verdikte lijnen naast de ordinaat).

The fractionation of organic acids from tomato plants by silicagel columns. Abscissa: fraction number; amount of 0.01 n NaOH which neutralized the acid in each fraction: volume of each fraction 2.5 ml; solvent; chloroform with increasing amounts of n-butanol; organic acids: 1. pyruvic acid, 2. succinic acid, 3. α-ketoglutaric acid, 4. aconitic acid, 5. oxalic acid, 6. malic acid, 7. citric acid, 8. isocitric acid; the encircled numbers give the fresh weight of the plant tissues, from which the preparation analyzed was prepared (indicated as thicker lines along the ordinate).

De organische zuren traden steeds in dezelfde volgorde uit de zuil en elk zuur correspondeerde met een bepaalde serie fracties. Wel moest bij dit laatste met een variatie van ± 5% rekening worden gehouden. Hoewel de zuren dus volgens het fractienummer geïdentificeerd konden worden, werd deze identificatie geverifieerd met behulp van de tweedimensionale papierchromatografie volgens WOLFGANG (1957), waarbij een mengsel van 80 delen 96 % ethanol, 4 delen ammonia en 16 delen water als eerste en een mengsel van 77 delen n-butanol, 12 delen mierenzuur en 11 delen water als tweede solvent toegepast werden. Nadat het in ons onderzoek gebruikte Ederol-202 filtreerpapier in een mengsel van 16 ml aniline, 5 gram glucose, 30 ml 96 % ethanol en 470 ml petroleumether (kp. 40–60° C) was gedompeld en gedurende 15 minuten bij 120° C was verhit, ontstonden op plaatsen, waar de zuren zich bevonden, bruine vlekken. Tien

druppels, elk van circa 3 μl, van een extract, waarbij 1 g vers gewicht correspondeerde met 1 ml, gaven een duidelijk beeld. De plaats van elk zuur op het filtreerpapier was steeds dezelfde, zodat de aard van de stoffen uit de planten onomstotelijk kwam vast te staan.

HEITEFUSZ (1957) gebruikte een mengsel van 2 gewichtsdelen aniline, 2 gewichtsdelen glucose, 60 gewichtsdelen n-butanol, 20 gewichtsdelen 96% ethanol en 20 gewichtsdelen water om de zuren zichtbaar te maken. Na bespuiting met dit mengsel en verhitting gedurende 15 minuten bij 120°C waren de zuren als bruine vlekken zichtbaar tegen een lichtbruine achtergrond. De kans op uitlopen van de vlekken was groot, omdat de zuren vrij goed in het fixatiemiddel oplosbaar waren. Deze oplosbaarheid werd aanzienlijk verminderd door n-butanol, water en een groot deel van de hoeveelheid ethanol te vervangen door petroleumether (kp. 40–60°C), zodat de filtreerpapieren in dit mengsel gedompeld konden worden. Hoewel minder glucose oploste, waren de zuren toch als bruine vlekken, maar nu tegen een vrijwel witte achtergrond, zichtbaar.

RESULTATEN

In onderstaande tabellen zijn de uitkomsten van de analysen weergegeven. De monsters van *Physalis floridana* werden 0, 7 en 21 dagen na de inoculatie genomen, die van *Nicotiana tabacum* var. White Burley 0, 7 en 14 dagen en die van tomaat 0, 7, 14 en 21 dagen na de infectie. In het laatste voorbeeld zijn alleen weergegeven de verschillen in gehalten van organische zuren van planten, 21 dagen na de inoculatie geoogst.

TABEL 1. De hoeveelheid organische zuren in microgramequivalenten per gram vers gewicht in gezonde en met virus besmette *Physalis floridana*.
The amount of organic acids in microgram-equivalents per gram fresh weight in healthy and virus-infected Physalis floridana.

	Gezonde planten *Healthy plants*			Planten met bladrolvirus *Plants with leaf roll virus*		Planten met X-virus *Plants with virus X*		Planten met Y-virus *Plants with virus Y*	
Dagen na de inoculatiedatum *Days after the inoculation-date*	0	7	21	7	21	7	21	7	21
Mengsel[1] . . . . *Mixture*	1,3	1,5	0,7	1,8	1,8	1,2	1,0	0,9	1,7
Oxaalzuur . . . . *Oxalic acid*	42,0	5,7	1,0	9,4	8,1	7,6	1,6	–	3,3
Appelzuur . . . . *Malic acid*	5,9	5,5	4,5	7,4	6,5	4,2	6,3	1,1	5,5
Citroenzuur . . . *Citric acid*	9,4	3,5	4,6	7,0	9,7	2,1	12,5	1,7	11,0
Isocitroenzuur . . *Isocitric acid*	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Totaal . . . . . *Total*	58,6	16,2	10,8	25,6	26,1	15,1	21,4	3,7	21,5

[1] Het mengsel bevat pyrodruive-, barnsteen-, α-ketoglutaar- en aconietzuur.
The mixture contained pyruvic, succinic, α-ketoglutaric and aconitic acids.

TABEL 2. Organische zuren in *Nicotiana tabacum* var. White Burley. Voor verklaring zie tabel 1.
Organic acids in Nicotiana tabacum *var. White Burley. For explanation see table 1.*

	Gezonde planten *Healthy plants*			Planten met X-virus *Plants with virus X*		Planten met Y-virus *Plants with virus Y*		Planten met tabaks-mozaïekvirus *Plants with tobacco mosaic virus*		Planten met kersevirus *Plants with cherry virus*	
Dagen na de inoculatiedatum *Days after the inoculation-date*	0	7	14	7	14	7	14	7	14	7	14
Mengsel . . . . *Mixture*	0,6	0,2	0,4	1,0	2,5	1,0	0,7	0,9	0,8	2,0	1,0
Oxaalzuur . . . *Oxalic acid*	0,4	0,4	0,1	0,9	1,4	1,2	0,7	0,8	1,2	2,0	1,5
Appelzuur . . . *Malic ocid*	0,7	0,2	0,1	5,4	4,5	4,7	4,2	2,9	3,8	5,2	3,6
Citroenzuur . . *Citric acid*	0,4	0,2	0,1	6,3	1,2	2,3	2,4	1,0	2,3	2,9	2,1
Isocitroenzuur . *Isocitric acid . .*	1,0	0,2	0,3	0,7	–	0,7	0,4	0,2	1,0	0,9	0,8
Totaal . . . . *Total*	3,1	1,2	1,0	14,3	9,6	9,9	8,4	5,8	9,1	13,0	9,0

TABEL 3. Organische zuren in *Lycopersicum esculentum.* Voor verklaring zie tabel 1.
Organic acids in Lycopersicum esculentum. *For explanation see tabel 1.*

	Gezonde planten *Healthy plants*				Planten met bladrolvirus *Plants with leaf roll virus*			Planten met X-virus *Plants with virus X*		
Dagen na de inoculatiedatum *Days after the inoculation-date*	0	7	14	21	7	14	21	7	14	21
Mengsel . . . . . . *Mixture*	2,8	1,8	2,6	2,1	4,5	2,3	1,6	1,8	2,8	5,6
Oxaalzuur . . . . . . *Oxalic acid*	3,5	1,3	2,2	5,9	1,4	3,7	11,0	1,9	2,7	9,3
Appelzuur . . . . . . *Malic acid*	9,5	9,6	12,9	13,8	6,8	13,2	12,7	6,0	11,4	37,5
Citroenzuur . . . . . *Citric acid*	7,3	4,7	10,6	14,2	4,0	10,8	20,7	4,3	13,7	37,4
Isocitroenzuur . . . . *Isocitric acid*	3,5	2,1	2,3	5,9	1,7	2,1	27,7	0,3	3,6	10,8
Totaal . . . . *Total*	26,6	19,5	30,6	41,9	18,4	32,1	73,7	14,3	34,2	100,6

Dagen na de inoculatiedatum *Days after the inoculation-date*	Planten met Y-virus *Plants with virus Y*			Planten met tabaks-mozaïekvirus *Plants with tobacco mosaic virus*			Planten met kersevirus *Plants with cherry virus*		
	7	14	21	7	14	21	7	14	21
Mengsel / *Mixture*	2,0	1,9	1,8	2,8	1,6	5,4	3,1	2,6	4,5
Oxaalzuur / *Oxalic acid*	3,5	2,4	11,6	3,3	3,6	9,4	4,3	2,4	2,8
Appelzuur / *Malic acid*	9,6	13,2	24,0	9,6	7,3	25,6	17,4	12,0	12,1
Citroenzuur / *Citric acid*	8,8	14,4	33,4	8,7	12,5	20,3	11,1	14,6	19,0
Isocitroenzuur / *Isocitric acid*	4,8	2,8	6,7	2,9	3,1	13,5	2,5	6,5	2,6
Totaal / *Total*	28,7	34,7	77,5	27,3	28,1	74,2	38,4	38,1	41,0

TABEL 4. Organische zuren in *Nicotiana tabacum* var. White Burley, 21 dagen na de inoculatie met tabaksmozaïekvirus. Planten gekweekt op KNOP-HOAGLAND-oplossing. Voor verklaring zie tabel 1.
Organic acids in Nicotiana tabacum *var. White Burley, 21 days after the inoculation with tobacco mosaic virus. Plants grown on* KNOP-HOAGLAND *solution. For explanation see tabel 1.*

	Gezond *Healthy*	Ziek *Diseased*
Mengsel/*Mixture*	18,0	8,3
Oxaalzuur/*Oxalic acid*	5,8	2,4
Appelzuur/*Malic acid*	11,9	37,6
Citroenzuur/*Citric acid*	11,6	11,8
Isocitroenzuur/*Isocitric acid*	4,2	2,4
Totaal/*Total*	51,5	62,5

Behalve de in de tabellen nader aangeduide zuren komen in geringe hoeveelheden de volgende stoffen voor: pyrodruive-, barnsteen-, α-ketoglutaar- en aconietzuur. De concentratie van deze zuren werd samengevat en aangeduid als mengsel.

Op de *Physalis*-planten traden acht dagen na de inoculatie met Y-virus kleine gele vlekjes op.

Het X-virus veroorzaakte na dezelfde tijd grotere gele vlekken, terwijl de andere virussen geen uiterlijke symptomen te zien gaven. Bij tabak traden reeds vier dagen na de infectie met X-virus en kersevirus kleine gele vlekjes op. Tabaksmozaïekvirus en Y-virus veroorzaakten hier na 10 dagen symptomen, respectievelijk mozaïekverschijnselen en een „vein clearing". Tomateplanten vertoonden zeven dagen na de infectie necrotische vlekjes door X-virus en door tabaksmozaïekvirus. Zeven dagen later trad door de infectie met kersevirus een topnecrose en door die met Y-virus een mozaïek op, terwijl bladrolvirus geen symtomen te zien gaf.

Het door SCHLEGEL (1958) in tabak gevonden glycerinezuur is hier wegens de geringe concentratie niet nader geïdentificeerd.

BESPREKING

Uit de tabellen blijkt, dat in het algemeen de totale zuurgehalten van de zieke planten aan het eind van de proeven aanmerkelijk hoger waren dan van de gezonde.

Opvallend is, dat de *Physalis*-planten een week na de inoculatie met X- en Y-virus in vergelijking met de gezonde een verminderde hoeveelheid zuur bevatten. Dit geldt niet na infectie met bladrolvirus. In hoofdzaak bepalen oxaal-, appel- en citroenzuur het zuurgehalte. Tijdens de ontwikkeling nemen deze bij de gezonde planten snel af. In de planten met X- en Y-virus is echter het gehalte aan citroenzuur na 21 dagen duidelijk toegenomen. Hoewel op de planten met bladrolvirus geen symptomen zichtbaar waren, vertonen deze toch een verhoogd zuurgehalte.

In gezonde tabaksplanten treedt tijdens de ontwikkeling eveneens een verlaging van de zuurconcentraties op, terwijl de zieke planten reeds na een week en lang, voordat de symptomen van tabaksmozaïekvirus en Y-virus zichtbaar waren, een toeneming in zuurgehalte te zien geven. Vooral appel- en citroenzuur nemen hieraan deel.

Een week na de inoculatie bevatten ook de tomateplanten met Y-virus, tabaksmozaïekvirus of kersevirus een grotere concentratie aan zuren, terwijl dit verhoogde gehalte in de planten met bladrolvirus of X-virus pas na 14 dagen te constateren is. Deze laatstgenoemde planten hebben na een week zelfs minder zuur dan de gezonde. Ook hier zijn voornamelijk appel- en citroenzuur bij de toeneming betrokken, oxaal- en isocitroenzuur in mindere mate. Ondanks de stijging in zuurgehalte waren de symptomen van Y-virus en kersevirus nog niet te zien.

De proef met tabaksplanten op KNOP-HOAGLAND-oplossing bevestigt de gevonden resultaten met planten in potculturen. Hier is de toeneming vooral aan een verhoogde appelzuurconcentratie toe te schrijven.

De naar verhouding toegenomen concentraties van appel- en citroenzuur worden waarschijnlijk door veranderingen in de fotosynthese, ademhaling en eiwitsynthese veroorzaakt.

Bij aardappelschijfjes vond BOSER (1957) een verlaagde ademhaling, wanneer de knollen X-virus of bladrolvirus bevatten, terwijl Y-virus een verhoogde ademhaling tot gevolg had. Deze uitkomst stemt overeen met onze resultaten bij tomateplanten, een week na de inoculatie.

Hoewel OWEN (1957) bij tabak, geïnfecteerd door tabaksmozaïekvirus, een verminderde fotosynthese-activiteit vond, waardoor minder substraat voor de zuurvorming aanwezig zou zijn, bleek het zuurgehalte in onze gevallen toe te nemen. Door VON WITSCH & POMMER (1954) werd de verlaagde fotosynthese bevestigd in proeven met bladrolvirus. Ook X-virus deed volgens OWEN (1958) de fotosynthese-activiteit bij White Burley tabak afnemen, doch verhoogde de ademhaling.

Beide verschijnselen zouden het zuurgehalte verlagen. Onze resultaten daarentegen zouden op een verminderd verbruik van organische zuren voor de eiwitsynthese wijzen. Inderdaad vond HENKE (1956), dat in bladrolzieke aardappelen (rassen Ackersegen en Mittelfrühe) minder stikstof in het eiwit werd vastgelegd.

Het wordt daarom waarschijnlijk geacht, dat door de virusinfectie het evenwicht tussen fotosynthese, ademhaling en eiwitsynthese zodanig verschuift, dat het gehalte van organische zuren en wel in het bijzonder dat van appel- en citroenzuur verhoogd wordt. Deze accumulatie van organische zuren zou zich voortzetten in de ophoping van de amiden asparagine en/of glutamine, zoals door ALLISON (1953) en door HENKE (1957) bij bladrolzieke aardappelknollen werd aangetoond.

SAMENVATTING

In dit onderzoek werden de concentraties van organische zuren in gezonde en in even oude, met virus geïnfecteerde planten vergeleken. Deze proefplanten waren *Physalis floridana*, *Nicotiana tabacum* var. White Burley en *Lycopersicum esculentum* var. Ailsa Gray. Partijen van 40 of 60 planten werden mechanisch geïnoculeerd, respectievelijk met X-virus, Y-virus, tabaksmozaïekvirus en een virus, dat rozetziektesymptomen op de kers veroorzaakt. Bovendien werd bladrolvirus, overgebracht door *Myzus persicae*, bij *Physalis* en tomaat in het onderzoek betrokken.

Zowel op de dag vån de inoculatie als 7, 14 en 21 dagen later werden 20 gezonde planten en 20 exemplaren van elke genoemde partij geoogst. Elk monster werd met water geëxtraheerd. Na zuivering van het extract door een sterke kationwisselaar Imac C 12 en concentratie in vacuo werden de organische zuren met behulp van silicagelzuilen en mengsels van chloroform en n-butanol als solvents kwantitatief bepaald. Twee dimensionale papierchromatografie maakte verificatie van de identificatie van de in de extracten voorkomende zuren mogelijk.

Behoudens een enkele uitzondering werd in het algemeen gevonden, dat de zieke planten hogere zuurgehalten bezitten dan de gezonde. Het wordt waarschijnlijk geacht, dat door de virusinfectie het evenwicht tussen de fotosynthese, de ademhaling en de eiwitsynthese zodanig verschuift, dat het gehalte van de organische zuren, speciaal dat van appel- en citroenzuur, verhoogd wordt.

SUMMARY

A number of publications, concerning special aspects of the relationship between virus synthesis and the metabolism of organic acids, showed a reciprocal influence. However a more general investigation into the influence of the virus infection on the changes in organic acids seemed necessary.

In the present paper the concentrations of organic acids in healthy plants and in those of the same age, infected with virus, are compared. For this purpose plants of *Physalis floridana*, *Nicotiana tabacum* var. White Burley and *Lycopersicum esculentum* var. Ailsa Gray were used. Groups of 40 or 60 plants were inoculated with potato virus X, potato virus Y, tobacco mosaic virus and a virus, causing symptoms of "rozet ziekte" in cherry respectively. The potato leaf roll virus, transmitted by *Myzus persicae*, was used with *Physalis* and tomato.

On the day of inoculation as well as 7, 14 and 21 days later 20 healthy plants and 20 specimen of each group, above mentioned, were harvested. These samples were boiled for five minutes in an amount of water of twice the fresh weight. After mixing, each suspension obtained was subjected to 10,000 atm. in a hydraulic press, the sap then centrifuged (8000 r.p.m. during 10 min.) and the

residue washed once. The combined supernatants were percolated through a strong cation-exchanger Imac C 12 (columns of 30 × 1.2 cm). The effluent contained the organic acids and the carbohydrates. Further purification appeared not to be necessary. The solution was concentrated in vacuo at 40–50° C and dried in a warm stream of air.

The organic acids in the dried preparations were analyzed according to the method of BULEN, VARNER & BURRELL (1952) on silicagel columns of 4 grams, the preparation of which is described by NIJKAMP (1954). As BULEN et al. worked with columns of 8 grams, we used proportional amounts of solvent mixtures of chloroform and n-butanol, recommended in their publications. After placing the column on a fraction collector, the fractions were titrated against 0.01 n NaOH, using bromothymolblue as an indicator.

Although each organic acid leaves the column at a definite fraction-number we verified the identifications of the acids by means of paper chromatography (WOLFGANG, 1957) on Ederol-202 filter paper. A mixture of 80 volumes of 96 % ethanol, 4 vol. of ammonia and 16 vol. of water as the first solvent and a mixture of 77 vol. of n-butanol, 12 vol. of formic acid and 11 vol. of water as the second solvent were used. After dipping the paper in a mixture of 16 ml aniline, 5 g glucose, 30 ml 96 % ethanol and 470 ml light petroleum (b.p. 40–60° C) and heating for 15 min. at 120° C the acids became visible as brown spots on a white background. Especially oxalic, malic and citric acids were demonstrated on the papers.

In general the tables show that during the development of the plants the content of organic acids, particularly of the oxalic, malic and citric acids, is lower in normal plants than in diseased ones. The *Physalis* plants, infected with the viruses X and Y and the tomatoes, inoculated with leaf roll virus and virus X are an exception to this. Their contents of organic acids being the same during the first week after the virus-inoculation as those of normal plants. The higher concentrations of the acids in tobacco could be shown very clearly already one week after the infection, whereas the symptoms were not yet visible. The same occurs in the case of tomatoes infected with virus Y, tobacco mosaic virus and the cherry virus.

Investigations by several authors have shown an increased respiration activity and a decrease in photosynthesis. It is assumed that the substrate for the synthesis of organic acids will be present at a lower rate. As the synthesis of proteins would be decreased, a higher content of organic acids would result.

De schrijver wil gaarne zijn dank betuigen aan de heren W. H. M. MOSCH en J. Ph. W. NOORDINK voor hun zeer toegewijde assistentie bij dit onderzoek. Gedurende korte tijd nam ook Mevrouw M. DWURAZNA (Botanical Institute, Cracow, Polen) aan onze werkzaamheden deel, waarvoor zijn oprechte dank.

LITERATUUR

ALLISON, R. M., – 1953. Effect of leaf roll virus infection on the soluble nitrogen composition of potato tubers. Nature 171: 573.

BOSER, H., – 1956/57. Einflusz pflanzlicher Virosen auf Stoffwechselfunktionen des Wirtes, I. Mitteilung: Glykolyse und Atmung gesunder und roll-, strichel- und mosaikkranker Kartoffeln. Biochem. Z. 328: 458–464.

BULEN, W. A., J. E. VARNER & R. C. BURRELL, – 1952. Separation of organic acids from plant-tissues, a chromatographic technique. Anal. Chem. 24: 187–190.

Heitefusz, R., – 1957. Erfahrungen zur quantitativen papierchromatographischen Bestimmung von organischen Säuren. Angew. Bot. 31: 61–62.
Henke, O., – 1954/'55. Untersuchungen des Stoffwechsels vergilbungskranker Zuckerrüben. Zentr.-Bl. f. Bakt., Paras. u. Infekt. Kr. Abt. II. 108: 134–147.
Henke, O., – 1956. Beitrage zum N-Stoffwechsel blattrollkranker Kartoffelpflanzen. Zentr.-Bl. f. Bakt., Paras. u. Infekt. Kr. Abt. II. 109: 367–388.
Henke, O., – 1957. Untersuchungen über den Stoffwechsel blattrollkranker Kartoffelpflanzen. Zentr.-Bl. f. Bakt., Paras. u. Infekt. Kr. Abt. II. 110: 361–377.
Nour-Eldin, F., – 1955. The effect of organic acids on tobacco mosaic virus multiplication. Phytopath. 45: 291.
Nijkamp, H. J., – 1954. A simple chromatographic method for the determination of the saturated straight-chain fatty acids C_{10}–C_{24}. Anal. chim. Acta 10: 448–458.
Owen, P. C., – 1957. The effect of infection with tobacco mosaic virus on the photosynthesis of tobacco leaves. Ann appl. Biol. 45: 456–461.
Owen, P. C., – 1958. Photosynthesis and respiration rates of leaves of Nicotiana glutinosa infected with tobacco mosaic virus and of N. tabacum infected with potato virus X. Ann. appl. Biol. 46: 198–204.
Pfaeltzer, H. J., – 1959. Onderzoekingen over de rozetziekte van de kers. T. Pl.-ziekten 65: 5–12.
Schlegel, D. E., – 1957. The stimulatory effect of organic acids in tobacco mosaic virus multiplication. Virology 4: 135–140.
Schlegel, D. E., – 1958. The organic acid composition of healthy and tobacco mosaic virus infected tobacco plants. Virology 6: 1–7.
Schlegel, D. E. & T. E. Rawlins, – 1954. A screening test of the effect of organic compounds on production of tobacco mosaic virus. J. Bacteriol. 67: 103–109.
Segretain, G. & L. Hirth, – 1953. Action de substances azotées sur la multiplication du virus de la mosaïque du tabac en culture de tissus. C.R. Soc. Biol., Paris 147: 1042–1043.
Venekamp, J. H., – 1955. The metabolism of amides and amino acids in etiolated seedlings of Lupinus luteus L. Acta bot. neerl. 4: 487–550.
Witsch, H. von & J. P. Pommer, – 1954. Tagesgänge der Assimilation gesunder und blattrollkranker Kartoffelpflanzen. Biol. Zentr.-Bl. 73: 1–11.
Wolffgang, H., – 1957. Mineralsäuren in Papierchromatogrammen pflanzlicher Extrakte. Naturwissensch. 44: 538.

DRUK: H. VEENMAN EN ZONEN N.V. – WAGENINGEN